

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 694 022

②1 N° d'enregistrement national : 92 09263

⑤1 Int Cl<sup>5</sup> : C 12 Q 1/04

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 21.07.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 28.01.94 Bulletin 94/04.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : INTERNATIONAL MYCOPLASMA  
(Société Anonyme) — FR.

⑦2 Inventeur(s) : Papierok Gérard, Pautrat Gérard et  
Escarguel Claude.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Marek Pierre.

⑤4 Procédé d'amplification des agents infectieux en diagnostic «in vitro» sur cultures cellulaires.

⑤7 Procédé d'amplification des agents infectieux en diagnostic "in vitro" sur cultures cellulaires, caractérisé par l'utilisation in vitro d'écosystème amplifiant la technique conventionnelle de culture cellulaire de virus (par exemple: HSV, RSV) et de bactéries (par exemple: Chlamydiae, Legionella, Hytéria). Selon une application particulièrement intéressante à la recherche des agents infectieux, on infecte lesdites cultures cellulaires "in vitro" avec des mycoplasmes permettant d'induire une réponse cellulaire potentialisée par la présence du ou des mycoplasmes utilisés.

FR 2 694 022 - A1



Procédé d'amplification des agents infectieux en diagnostic "in vitro" sur cultures cellulaires.

05 La présente invention concerne un procédé d'amplification des agents infectieux en diagnostic "in vitro" sur cultures cellulaires mycoplasmisées.

La culture cellulaire est encore la technique de référence pour le diagnostic de nombreuses maladies infectieuses. La spécificité cellulaire souvent associée avec un effet cytopathogène caractéristique, est  
10 généralement confirmée par une détection immunologique révélant une structure antigénique spécifique de l'agent infectieux recherché. La culture cellulaire fournit alors une phase d'amplification de cet agent. Par exemple, le HSV (Herpès Simplex Virus) est ainsi recherché sur cellules  
15 Véro, le Chlamydiae sur cellules Mac Coy, le RSV (Virus Respiratoire Syncytial) sur les cellules Hep-2, etc.

Certaines infections étant rares et de développement difficile sur cultures cellulaires, d'une part (exemple Chlamydiae), et le germe recherché pouvant être peu  
20 abondamment représenté dans le prélèvement, d'autre part, il importe d'optimiser au maximum le système de diagnostic in vitro des agents infectieux correspondants, notamment par un procédé d'amplification préalable du nombre d'agents infectieux. C'est le but de la présente invention, qui a en  
25 outre l'intérêt de mettre en évidence le rôle de ce type de cofacteur en pathologie humaine et de compléter un modèle in vitro dans le sens des écosystèmes plus proche de la réalité in vivo.

Longtemps considérés comme opportunistes ou associés à  
30 certaines infections, les mycoplasmes ont aussi été suspectés d'être eux-mêmes responsables de pathologies. Le travail ayant conduit à la présente invention a consisté à étudier in vitro l'impact des mycoplasmes sur d'autres infections, notamment celles où les mycoplasmes étaient  
35 considérés comme fréquemment associés (pathologies de la sphère uro-génitale et pulmonaire).

Selon le procédé de l'invention, on infecte

volontairement des cellules cultivées "in vitro" avec des mycoplasmes. Cette inoculation permet d'induire une réponse cellulaire potentialisée par la présence du ou des mycoplasmes utilisés.

05        Selon une application particulièrement intéressante, l'invention concerne la "mycoplasmisation" de cellules, utilisées, entre autre, pour la détection de certains agents infectieux, par des mycoplasmes potentialisant de façon importante l'infectiosité de ces agents, et l'utilisation  
10 biotechnologique qui en découle, notamment en terme d'amplification de signal.

      Le néologisme "mycoplasmisation" désignera le fait d'infecter volontairement des cellules avec des mycoplasmes, dans un but précis. Ces cellules seront dites  
15 "mycoplasmisées", par opposition à l'appellation "cellules mycoplasmées" qui sous-entend que ces dernières ont été contaminées par hasard.

      Dans l'application avantageuse susmentionnée, l'invention concerne la mise en évidence et l'utilisation  
20 biotechnologique du pouvoir amplificateur du mycoplasme dans la recherche d'agents infectieux inoculés "in vitro" à des cultures de cellules ; cellules et mycoplasmes étant, dans ce cas, choisis en fonction de la sphère où le prélèvement est effectué, et de l'agent recherché.

25        Font partie de l'invention :

- tout système cellulaire, mycoplasmisé expérimentalement, et dans le but d'induire une réponse cellulaire potentialisée par la présence du ou des mycoplasmes utilisés ;
- 30 - tout système cellulaire mycoplasmé, utilisé dans le but d'induire une réponse cellulaire potentialisée par la présence du ou des mycoplasmes.

      Plus généralement, le procédé selon l'invention consiste en l'utilisation in vitro d'écosystème amplifiant la

(amycidae, mycoplasma, bacteria, etc.)

L'Ecosystème considéré consistant en : tout système

cellulaire constitué de cellules sensibles aux agents infectieux susceptibles de se trouver dans une sphère pathologique où est effectué le prélèvement (le système pouvant être constitué d'un ou plusieurs types de cellules selon les besoins) + mycoplasmes comme agent potentialisateur de la multiplication virale en culture cellulaire.

- Les travaux et expérimentations ayant abouti à la présente invention ont essentiellement porté sur deux sphères pathologiques :
- uro-génitale avec le HSV (cellules Véro) et Chlamydiae Trachomatis (cellules Mac Coy) ;
  - pulmonaire avec le RSV (cellules Hep-2) et Chlamydiae Twar (cellules Hela) ;
- et sur divers mycoplasmes :
- ceux ayant un tropisme particulier pour la sphère uro-génitale (Uu : Uréaplasma uréaliticum, Mh : Mycoplasma hominis) et pulmonaire (MP : Mycoplasma pneumoniae)
  - ceux qui sont les plus répandus (MF : M. Fermentans, MS : M. Salivarium, MG : M. Genitalium, MO : M. Orale, MHy : M. Hyorinis, MA : M. Arginini, MPi : M. Pirum, MN : M. Nou (souche MPi), etc.

Pour cette raison, dans la description de l'exemple de mise en oeuvre du procédé de l'invention qui est faite ci-après, l'application des cellules mycoplasmisées porte essentiellement sur la prévention et la détection des MST (Maladies Sexuellement Transmissibles), des cancers du col, et de toutes maladies dont l'agent infectieux est potentialisé par un mycoplasme. Il ne s'agit cependant pas d'une application limitative.

#### I - Mycoplasmisation des cellules

Les cellules sont cultivées dans des boîtes ; elles sont mycoplasmisées à confluence. Les mycoplasmes utilisés pour infecter ces cellules sont préalablement amenés en phase de croissance dans leur milieu (milieu de culture pour mycoplasmes additionné d'un indicateur coloré).

Les cultures de cellules sont infectées dans un milieu compatible avec la double viabilité : cellule et mycoplasme.

La croissance est déterminée par une modification de la

couleur du milieu.

Les boîtes sont vidées de leur surnageant, puis infectées sous un inoculum du milieu contenant les mycoplasmes, additionné par du milieu de culture cellulaire. Les boîtes sont incubées environ une heure sous agitation lente, entre 36°C et 39°C, puis le milieu est complété par du milieu de culture cellulaire. Les boîtes complémentées au milieu de culture sont contrôlées au microscope, puis sont trypsinées 2 à 3 jours après l'infection, et cultivées dans leur milieu habituel.

Les signes de contamination sont fréquemment visibles en microscopie optique (pourtour cellulaire et morphologie générale), mais les cellules sont généralement viables et peuvent être cultivées.

## II - Détection des mycoplasmes

Différents systèmes peuvent être utilisés :

- Sonde nucléique chaude ou froide spécifique des mycoplasmes permettant la détection du DNA des mycoplasmes par hybridation moléculaire ;
- Anticorps monoclonaux permettant la détection d'un antigène spécifique de mycoplasme par révélation immunoenzymatique sur membrane en utilisant un monoclonal dirigé contre cet antigène et un anti-souris conjugué à la peroxydase ;
- Culture en milieu solide ou liquide permettant la détection directe ou indirecte des mycoplasmes.

## III - Mise en évidence de la potentialité du mycoplasme comme cofacteur augmentant la sensibilité de test de diagnostic "in vitro".

L'augmentation de signal dû à la présence de mycoplasmes dans des cultures cellulaires est mise en évidence par comparaison entre les niveaux d'infection obtenus avec cellules mycoplasmisées et cellules homologues normales (non infectées par des mycoplasmes). Les infections ont lieu

Les exemples donnés ci-dessous portent sur les virus parv et RSV, ainsi que sur le Chlamydiae.

- 1/ Infection

Les infections sont réalisées selon un protocole standard. Les cellules (mycoplasmisées et non mycoplasmisées témoin) sont vidées de leur surnageant et inoculées sous lente agitation pendant 1 heure à 37°C par l'agent infectieux sous faible volume (dilution dans du milieu de culture cellulaire sans sérum, appelé supplément). Du supplément est ensuite ajouté, puis les cellules sont incubées à 37°C pendant 3 Jours.

- 2/ Révélation de l'infection

Elle est faite par marquage immunologique sur membrane d'un antigène spécifique de l'agent infectieux, détecté par un anticorps monoclonal dirigé contre cet antigène, et marqué à une enzyme, elle-même révélée par un substrat chromogène. L'intensité de la coloration, exprimée en + sur une échelle allant de 0 à 4+ (+/- représentant la valeur maximum assimilable à du bruit de fond) est proportionnelle à la quantité d'antigènes présents, et permet d'évaluer l'intensité de l'infection. La sensibilité de cette technique immunologique a été confirmée par la classique détermination du titre infectieux par titrage en dilution limité sur microplaque.

Abréviations utilisées dans les exemples donnés dans les tableaux suivants : DI = détection immunologique, avec contrôle négatif sans agent infectieux, afin de voir si la cellule mycoplasmisée ne cross-réagit pas avec le monoclonal. DM = détection de mycoplasme.

Tableau I - HSV

Cellule	DI/HSV+	DI/HSV-	DM
Véro Témoin	+	+/-	-
Véro-MP	2+	+/-	+
Véro-MH	4+	+/-	+
Véro-MF	2+	+/-	+
Véro-UU	4+	+/-	+
Véro-MS	3+	+/-	+

Tableau II - Chlamydiae, à différentes dilutions de Chlamydiae sur cellules Mac Coy avec et sans MP : étude de sensibilité.

05

Cellule	DI/Chlamyd+	DI/Chlamyd-	DM	Dilution
Témoin				
M.Coy	1,5+	+/-	-	Pur
M.Coy-MP	3+	+/-	+	
M.Coy	1,5+	+/-	-	1/2
M.Coy-MP	2+	+/-	+	
M.Coy	1	+/-	-	1/5
M.Coy-MP	2+	+/-	+	
M.Coy	+	+/-	-	1/10
M.Coy-MP	1,5+	+/-	+	

15

Ce dernier tableau est particulièrement significatif dans le cas du Chlamydiae. Il montre qu'un résultat douteux, proche de +/-, peut devenir beaucoup plus net et franchement positif.

Tableau III- RSV

20

Cellule	DI/RSV+	DI/RSV-	DM
Hep-2	+	+/-	-
Hep-2-MP	2,5+	+/-	+

Après l'exposé qui précède, on comprend que selon la présente invention, l'activité des mycoplasmes comme cofacteur d'infection virale ou bactérienne peut être

... mycoplasmes mycoplasmisés

D'autre part, le choix du mycoplasme pour la sphère

pathologique concernée, est particulièrement important. Il donne toute sa valeur clinique au terme "cofacteur".

05 L'exemple exposé à propos du HSV montre, en effet, que pour potentialiser au maximum la culture, on aura tout intérêt à utiliser des cellules Véro mycoplasmisées avec Uu ou Mh, qui sont justement et également des germes de la sphère uro-génitale, fréquemment associés voire incriminés dans de nombreuses pathologies de cette région.



## R E V E N D I C A T I O N S

1. Procédé d'amplification des agents infectieux en diagnostic "in vitro" sur cultures cellulaires, caractérisé par l'utilisation d'écosystème représentatif de la sphère pathologique concernée, reconstitué in vitro avec des  
5 cellules permissives pour lesdits agents, additionnées de mycoplasmes comme élément de potentialisateur de la multiplication virale ou bactérienne en culture cellulaire de virus (par exemple: HSV, RSV) et de bactéries (par exemple : Chlamydiae, Legionella, Hystéria).
- 10 2. Procédé d'amplification des agents infectieux en diagnostic "in vitro" sur cultures cellulaires, selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on infecte lesdites cultures cellulaires "in vitro" avec des mycoplasmes permettant d'induire une réponse cellulaire potentialisée  
15 par la présence du ou des mycoplasmes utilisés.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on utilise pour la recherche et l'amplification des agents infectieux, des cellules et des mycoplasmes choisis en fonction de la sphère où le prélèvement est effectué, et des  
20 agents infectieux recherchés.
4. Procédé suivant l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que les cultures de cellules sont infectées, dans un milieu compatible avec la double viabilité cellule et mycoplasme, avec des mycoplasmes préalablement amenés en  
25 phase de croissance dans leur milieu de culture.
5. Procédé selon la revendication 4, suivant lequel les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture, caractérisé en ce que leur infection ou mycoplasminisation est opérée de la manière suivante : les boîtes sont vidées de  
le contenu, les cellules sont lavées avec un milieu de culture et ensuite incubées environ une heure sous agitation lente, entre 36 degrés C et 39 degrés C ; les boîtes complémentées au milieu de culture sont contrôlées au

microscope ; elles sont trypsinées 2 à 3 jours après l'infection, et cultivées dans leur milieu habituel.

05 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que l'augmentation de signal dû à la présence de mycoplasmes dans des cultures cellulaires, est mise en évidence par comparaison entre les niveaux d'infection obtenus avec cellules mycoplasmisées et cellules homologues normales ; les infections ayant lieu simultanément avec un inoculum homogène, sur des cellules à  
10 même état de confluence.

15 7. Procédé suivant la revendication 6, caractérisé en ce que la révélation de l'infection est obtenue par marquage immunologique sur membrane d'un antigène spécifique de l'agent infectieux, détecté par un anticorps monoclonal dirigé contre cet antigène, et marqué à une enzyme, elle-même révélée par un substrat chromogène ; l'intensité de la coloration, exprimée en + sur une échelle allant de 0 à 4+ (+/- représentant la valeur maximum assimilable à du bruit de fond), est proportionnelle à la quantité  
20 d'antigènes présents et permet d'évaluer l'intensité de l'infection ; le niveau de détection étant confirmé par titrage classique du pouvoir infectieux par dilution limité sur microplaque.

25 8. Procédé selon l'une des revendications 6 ou 7, appliqué à la révélation d'une infection virale ou bactérienne, caractérisé en ce que l'infection de la culture cellulaire, préalable à ladite révélation, est réalisée selon un protocole standard ; les cellules (mycoplasmisées et non mycoplasmisées témoin) sont vidées de leur surnageant, et  
30 inoculées sous lente agitation pendant une heure à 37°C par l'agent infectieux sous faible volume (dilution dans du milieu de culture cellulaire sans sérum, appelé supplément), du supplément est ensuite ajouté, puis les cellules sont incubées à 37°C pendant 3 jours.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

**RAPPORT DE RECHERCHE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9209263  
FA 476994

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS vol. 170, no. 3, 1990, NEW YORK NY USA pages 1365 - 1370 I.H. CHOWDHURY 'Mycoplasma can enhance HIV replication in vitro; a possible co-factor responsible for the progression of AIDS.' * le document en entier *	1-8	
A	DISSERTATION ABSTRACTS INTERNATIONAL B vol. 34, no. 4, 1973, PHILADELPHIA PA USA pages 1652 - 1653 W.H. MILLIGAN III 'Effect of mycoplasma pneumoniae on rhinovirus replication in cell culture.' * le document en entier *	1-8	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C12Q G01N

Date d'achèvement de la recherche

Examinateur

3

1-10 FORM 1503

A : particulièrement pertinent à lui seul  
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un  
autre document de la même catégorie  
A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication  
ou arrière-plan technologique général  
O : divulgation non-écrite  
P : document intercalaire

document de brevet bénéficiant d'une date antérieure  
à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date  
de dépôt ou qu'à une date postérieure.  
D : cité dans la demande  
L : cité pour d'autres raisons  
& : membre de la même famille, document correspondant

